

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02010/061919**

発行日 平成24年4月26日 (2012. 4. 26)

(43) 国際公開日 **平成22年6月3日 (2010. 6. 3)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 7/06 (2006.01)</b>	C07K 7/06 ZNA	4B065
<b>C12N 5/078 (2010.01)</b>	C12N 5/00 O2J	4C076
<b>A61K 47/24 (2006.01)</b>	A61K 47/24	4C084
<b>A61K 9/127 (2006.01)</b>	A61K 9/127	4C085
<b>A61P 37/04 (2006.01)</b>	A61P 37/04	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 36 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2010-540525 (P2010-540525)	(71) 出願人	000004341 日油株式会社 東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2009/070043	(71) 出願人	504013775 学校法人 埼玉医科大学 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38
(22) 国際出願日	平成21年11月27日 (2009.11.27)	(71) 出願人	591222245 国立感染症研究所長 東京都新宿区戸山一丁目23番1号
(31) 優先権主張番号	特願2008-304965 (P2008-304965)	(74) 代理人	100088155 弁理士 長谷川 芳樹
(32) 優先日	平成20年11月28日 (2008.11.28)	(74) 代理人	100128381 弁理士 清水 義憲
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100126653 弁理士 木元 克輔
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 SARSコロナウイルスの細胞傷害性T細胞エピトープペプチド及びその用途

## (57) 【要約】

本発明は、SARSコロナウイルスの新規なCTLエピトープペプチドを提供することを目的とする。本発明は、配列番号10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 23及び24からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 23 及び 24 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチド。

## 【請求項 2】

ペプチドがリポソームの表面に結合しているペプチド結合リポソームであって、リポソームが、不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有するリン脂質、及び、安定化剤を含有し、ペプチドが、請求項 1 に記載のペプチドから選択される少なくとも 1 種である、ペプチド結合リポソーム。

10

## 【請求項 3】

前記リン脂質が、不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基を有するリン脂質である、請求項 2 に記載のペプチド結合リポソーム。

## 【請求項 4】

前記リン脂質が、オレオイル基を有するリン脂質である、請求項 2 に記載のペプチド結合リポソーム。

## 【請求項 5】

前記リン脂質が、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジルグリセロール、ジアシルホスファチジン酸、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジリエタノールアミン、サクシニイミジル - ジアシルホスファチジリエタノールアミン、及び、マレイミド - ジアシルホスファチジリエタノールアミンから選ばれる少なくとも 1 つである、請求項 2 に記載のペプチド結合リポソーム。

20

## 【請求項 6】

前記安定化剤がコレステロールである、請求項 2 に記載のペプチド結合リポソーム。

## 【請求項 7】

請求項 1 に記載のペプチドから選択される少なくとも 1 種が、リポソームに含まれる不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有するリン脂質に結合している、請求項 2 に記載のペプチド結合リポソーム。

## 【請求項 8】

リポソームが以下の組成を有する、請求項 2 に記載のペプチド結合リポソーム：  
(A) 不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有するリン脂質 1 ~ 99.8 モル%；  
(B) 安定化剤 0.2 ~ 75 モル%。

30

## 【請求項 9】

以下の組成を有するペプチド結合リポソーム：  
(I) 不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有する酸性リン脂質 1 ~ 85 モル%；  
(II) 不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有する中性リン脂質 0.01 ~ 80 モル%；  
(III) 請求項 1 に記載のペプチドから選択される少なくとも 1 種が結合した、不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有するリン脂質 0.2 ~ 80 モル%；  
(IV) 安定化剤 0.2 ~ 75 モル%。

40

## 【請求項 10】

細胞表面抗原 HLA - A2 を発現する細胞を *in vitro* において請求項 1 に記載のペプチドから選択される少なくとも 1 種と接触させることにより調製された抗原提示細胞。

## 【請求項 11】

前記細胞が自己由来である請求項 10 に記載の抗原提示細胞。

50

## 【請求項 1 2】

前記細胞が同種由来である請求項 1 0 に記載の抗原提示細胞。

## 【請求項 1 3】

請求項 1 に記載のペプチドから選択される少なくとも 1 種を有効成分として含有する、SARS コロナウイルス特異的な H L A - A 2 拘束性 C T L の誘導剤。

## 【請求項 1 4】

請求項 1 に記載のペプチドから選択される少なくとも 1 種を有効成分として含有する、SARS コロナウイルスの感染を予防するためのワクチン。

## 【請求項 1 5】

請求項 2 ~ 9 のいずれか一項に記載のペプチド結合リボソームを有効成分として含有する、SARS コロナウイルス特異的な H L A - A 2 拘束性 C T L の誘導剤。 10

## 【請求項 1 6】

請求項 2 ~ 9 のいずれか一項に記載のペプチド結合リボソームを有効成分として含有する、SARS コロナウイルスの感染を予防するためのワクチン。

## 【請求項 1 7】

請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の抗原提示細胞を有効成分として含有する、SARS コロナウイルス特異的な H L A - A 2 拘束性 C T L の誘導剤。

## 【請求項 1 8】

請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の抗原提示細胞を有効成分として含有する、SARS コロナウイルスの感染を予防するためのワクチン。 20

## 【請求項 1 9】

C p G - D N A をさらに含む、請求項 1 3 又は 1 5 に記載の SARS コロナウイルス特異的な H L A - A 2 拘束性 C T L の誘導剤。

## 【請求項 2 0】

C p G - D N A をさらに含む、請求項 1 4 又は 1 6 に記載の SARS コロナウイルスの感染を予防するためのワクチン。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、SARS コロナウイルスの細胞傷害性 T 細胞エピートープペプチド及びその用途に関する。 30

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

重症急性呼吸器症候群 ( S e v e r e A c u t e R e s p i r a t o r y S y n d r o m e 、 S A R S ) は、新規の SARS コロナウイルス ( S A R S - C o V ) による致死率の高い新興感染症である。2003 年の中国におけるアウトブレイク以来、8000 人以上が感染し約 800 人が死亡した。しかしながら、未だに有効な予防・治療法がない。SARS 発生以降、SARS の原因ウイルスである SARS ウイルスが同定され ( 非特許文献 1 ) 、その塩基配列が決定されている ( 非特許文献 2 ) 。

## 【0 0 0 3】

SARS コロナウイルスは、一本鎖 ( + ) R N A ウイルスのコロナウイルス科に属する新種のコロナウイルスである。SARS コロナウイルスゲノムは非常に大きく、29.7 kb あり ( 非特許文献 2 ) 、推定上の 23 のタンパク質をコードする。主要な構造タンパク質としては、スパイク ( S p i k e 、 1 2 5 6 a a ) 、ヌクレオカプシド ( N u c l e o c a p s i d 、 4 2 3 a a ) 、膜 ( M e m b r a n e 、 2 2 2 a a ) 及び小さなエンベロープ ( E n v e l o p e 、 7 7 a a ) がある。非構造タンパク質としては、2 つのポリプロテイン p p 1 a ( 4 3 8 2 a a 、配列番号 3 1 ; G e n B a n k 登録番号 A A P 1 3 4 3 9 ) と p p 1 b ( 2 6 9 6 a a ) があり、これらのポリプロテインから個々のタンパク質がプロテアーゼによって部位特異的に切り出される。

## 【先行技術文献】

40

50

## 【非特許文献】

## 【0004】

【非特許文献1】Ksiazek, T. G. et al., N. Engl. J. Med. 348:1953-1966(2003)

【非特許文献2】Marra, M. A. et al., Science 300:1399-1404(2003)

【非特許文献3】Yang, Z. Y. et al., Nature 428:561-564(2004)

【非特許文献4】Wang, Y. D. et al., J. Virol. 78:5612-5618(2004)

【非特許文献5】Chen, H. et al., J. Immunol. 175:591-598(2005)

【非特許文献6】Zhou, M. et al., J. Immunol. 177:2138-2145(2006)

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

これまでに、スパイクタンパク質をコードするDNAワクチンによりウイルス中和抗体が誘導されることが報告されている(非特許文献3)。有効な防御反応には体液性免疫及び細胞性免疫が必要であるが、SARSコロナウイルスに関する分野では、体液性免疫に比べて細胞性免疫は未だ研究が進んでいない。細胞性免疫においてウイルス防御に重要な役割を果たしているのは、細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte、CTL)であり、SARSコロナウイルス特異的CTL活性を制御することがSARSコロナウイルスに対する新たな治療となり得る可能性がある。この観点から、SARSコロナウイルスタンパクにおいて抗原性の強いCTLエピトープペプチドの同定が望まれている。SARSコロナウイルス特異的なCTLエピトープペプチドとしては、これまでに構造タンパク質であるスパイクタンパク質由来の部分ペプチドが数種類同定されている(非特許文献4~6)。しかしながら、非構造タンパク質由来のCTLエピトープペプチドについては、これまで何ら報告されていない。

## 【0006】

本発明は、SARSコロナウイルスの新規なCTLエピトープペプチドを提供することを目的とする。さらに詳しくは、本発明は、SARSコロナウイルスpp1aタンパク質由来の新規なCTLエピトープを含むペプチド、ペプチド結合リポソーム及び抗原提示細胞を提供することを目的とする。また、当該ペプチド、ペプチド結合リポソーム又は抗原提示細胞を有効成分とするSARSコロナウイルス特異的なHLA-A2拘束性CTLの誘導剤、SARSコロナウイルスの感染を治療又は予防するためのワクチンなどを提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明者は、これまでに報告のないSARSコロナウイルス由来のCTLエピトープを同定するために、以下の検討を行った。まず、SARSコロナウイルスの非構造タンパク質であるpp1aタンパク質に着目し、予測したエピトープ候補ペプチドの中から30種類のペプチドを選択した。次に、ペプチドがMHCクラスI分子であるHLA-A2分子への結合アフィニティを有することを確認し、エピトープ候補ペプチドのうち特に9種類のペプチドが有意にCTL誘導活性を有することを見いだした。さらに、ペプチドを含むペプチド結合リポソームを免疫することにより、CTL誘導が惹起されること、及び、in vivoにおいてCTL応答が活性化されることを明らかにした。かかる知見に基づき、本発明者は、SARSコロナウイルスpp1aタンパク質由来の新規なCTLエピトープを含むペプチドを提供することを可能とし、本発明を完成するに至った。

## 【0008】

すなわち、本発明は、配列番号 10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 23 及び 24 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチドを提供する。また、本発明のペプチドは、配列番号 10, 12, 15, 17 及び 24 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むことが好ましく、配列番号 24 のアミノ酸配列を含むことがより好ましい。本発明のペプチドは、SARS コロナウイルス特異的な細胞傷害性 T 細胞エピトープを含むペプチドであり、HLA - A2 拘束性細胞傷害性 T 細胞エピトープを含むペプチドであることを特徴とする。

【0009】

本発明は、ペプチドがリポソームの表面に結合しているペプチド結合リポソームであって、リポソームが、不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有するリン脂質、及び、安定化剤を含有し、ペプチドが、上記ペプチドから選択される少なくとも 1 種である、ペプチド結合リポソームを提供する。

10

【0010】

上記リン脂質は、不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基を有するリン脂質であることが好ましく、オレオイル基を有するリン脂質であることがより好ましい。また、上記リン脂質は、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジルグリセロール、ジアシルホスファチジン酸、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、サクシンイミジル - ジアシルホスファチジルエタノールアミン、及び、マレイミド - ジアシルホスファチジルエタノールアミンから選ばれる少なくとも 1

20

【0011】

リポソームに含まれるリン脂質がこのような構成を備えることにより、病原体感染細胞を殺傷するための CTL を効率よく増強することができ、感染症を予防・治療することができる。

【0012】

上記安定化剤は、コレステロールであることが好ましい。この構成により、上記リポソームをより安定化することができる。

【0013】

上記ペプチドは、上記リポソームに含まれるリン脂質に結合していることが好ましい。これにより、ペプチドをリポソーム表面に提示することができ、より効果的に SARS コロナウイルス特異的な CTL 誘導を惹起することができる。

30

【0014】

また、本発明のペプチド結合リポソームは、リポソームが以下の組成を有することが好ましい。

(A) 不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有するリン脂質 1 ~ 99.8 モル% ;

(B) 安定化剤 0.2 ~ 75 モル%。

【0015】

また、本発明のペプチド結合リポソームは、以下の組成を有することが好ましい。

40

(I) 不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有する酸性リン脂質 1 ~ 85 モル% ;

(II) 不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有する中性リン脂質 0.01 ~ 80 モル% ;

(III) 上記ペプチドから選択される少なくとも 1 種が結合した、不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有するリン脂質 0.2 ~ 80 モル% ;

(IV) 安定化剤 0.2 ~ 75 モル%。

【0016】

本発明は、細胞表面抗原 HLA - A2 を発現する細胞を *in vitro* において上記

50

ペプチドから選択される少なくとも1種と接触させることにより調製された抗原提示細胞を提供する。上記細胞は、自己由来であることが好ましく、同種由来であることが好ましい。

【0017】

また、本発明は、上記ペプチドから選択される少なくとも1種、上記ペプチド結合リポソーム又は上記抗原提示細胞を有効成分として含有するSARSコロナウイルス特異的なHLA-A2拘束性CTLの誘導剤を提供する。

【0018】

本発明は、上記ペプチドから選択される少なくとも1種、上記ペプチド結合リポソーム又は上記抗原提示細胞を有効成分として含有するSARSコロナウイルスの感染を予防するためのワクチンを提供する。

10

【0019】

さらに、本発明は、SARSコロナウイルスに対する免疫性を提供する必要がある対象に、免疫性を提供する方法であって、上記対象に上記ペプチドから選択される少なくとも1種、上記ペプチド結合リポソーム又は上記抗原提示細胞を投与することを含む方法を提供する。

【0020】

本発明は、SARSコロナウイルスに対して免疫性を提供する必要がある対象に、免疫性を提供する方法であって、上記対象から細胞を採取し、細胞を*in vitro*において上記ペプチドから選択される少なくとも1種と接触させることにより抗原提示細胞を調製し、抗原提示細胞を上記対象に再注入することを含む方法を提供する。上記細胞は、リンパ系単核細胞であることが好ましく、樹状細胞であることがさらに好ましい。

20

【発明の効果】

【0021】

本発明は、SARSコロナウイルスpp1aタンパク質由来の新規なCTLエピトープを含むペプチド、ペプチド結合リポソーム及び抗原提示細胞を提供する。また、当該ペプチド、ペプチド結合リポソーム又は抗原提示細胞により、CTL誘導が惹起されること、及び、*in vivo*においてCTL応答が活性化されることから、本発明のペプチド、ペプチド結合リポソーム及び抗原提示細胞は、いずれもSARSコロナウイルスの排除を目的としたCTL誘導剤及び/又はワクチンとして使用することができる。また、非構造タンパク質はウイルスの感染の過程において構造タンパク質よりも先に合成されるため、非構造タンパク質であるpp1aタンパク質由来のCTLエピトープを用いて免疫反応を活性化することにより、ウイルス感染初期でのウイルス排除効果が期待できる。

30

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】ペプチド結合リポソームを用いて免疫したマウスにおけるフローサイトメトリーによるCD8とIFN- $\gamma$ の染色プロット

【図2】spike-1203ペプチド結合リポソームを用いて免疫したマウスにおけるフローサイトメトリーによるCD8とIFN- $\gamma$ の染色プロット

【図3】CFSE標識された抗原提示細胞を追加免疫したマウスにおけるフローサイトメトリーによるCFSEの染色プロット

40

【発明を実施するための形態】

【0023】

以下、発明を実施するための最良の実施形態について詳細に説明する。

【0024】

本発明におけるペプチドとは、SARSコロナウイルスpp1aタンパク質由来のCTLエピトープを含むものであり、具体的には配列番号10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 23及び24からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチド、並びに、配列番号10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 23及び24からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。また、配列番号10, 12, 15

50

、17及び24からなる群より選択されるアミノ酸配列が好ましく、配列番号24のアミノ酸配列がより好ましい。これらのペプチドは、HLA-A2拘束性CTLエピトープを含むものであり、より具体的には、HLA-A\*0201拘束性CTLエピトープを含むものである。また、本発明のペプチドは、本来のCTLエピトープ活性が損なわれないことを条件として、様々な形態（例えば、未変性、融合体、グリコシル化、非グリコシル化など）で用いることができ、C末端修飾（アミド化、エステル化、アルデヒド化等）、N末端修飾（アセチル化、ビオチン化、蛍光標識等）及び官能基の化学修飾（リン酸化、硫酸化、ビオチン等）を含んでいても良い。

#### 【0025】

ここで、ペプチドの合成については、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて行うことができる。公知のペプチド合成法としては文献（Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966、The Proteins, Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976、ペプチド合成, 丸善(株), 1975、ペプチド合成の基礎と実験, 丸善(株), 1985、医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991）などに記載されている方法が挙げられる。

10

#### 【0026】

以上のような本発明のペプチドは、1種又は2種以上組み合わせることにより、SARSコロナウイルス特異的なHLA-A2拘束性CTLの誘導剤、及び/又は、SARSコロナウイルスの感染を治療又は予防するためのワクチンとして使用することができる。すなわち本発明のペプチドはHLA-A2分子と結合し、HLA-A2分子を発現する細胞に提示されてCTLを強く誘導することができることから、本発明のペプチドは、SARSコロナウイルスの排除を目的としたCTL誘導剤及び/又はワクチンとして使用することができる。

20

#### 【0027】

本発明のペプチド結合リボソームに用いられるリボソームとは、閉鎖空間を有するリン脂質二重膜のことを指す。

#### 【0028】

本発明のペプチド結合リボソームに用いられるリボソームは、不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有するリン脂質、及び、安定化剤を含有する。リン脂質としては、不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基を有するリン脂質が好ましく用いられる。

30

#### 【0029】

不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基を有するリン脂質における、アシル基の炭素数は、好ましくは16～22であり、更に好ましくは18～22であり、最も好ましくは18である。アシル基としては、具体的には、パルミトオレオイル基、オレオイル基、エルコイル基等が挙げられ、最も好ましくはオレオイル基である。不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有するリン脂質における、炭化水素基の炭素数は、好ましくは16～22であり、更に好ましくは18～22であり、最も好ましくは18である。炭化水素基としては、具体的には、テトラデセニル基、ヘキサデセニル基、オクタデセニル基、C20モノエン基、C22モノエン基、C24モノエン基等が挙げられる。リン脂質が有するグリセリン残基の1-位、及び2-位に結合する不飽和のアシル基又は不飽和炭化水素基は、同一でも異なってもよい。工業的な生産性の観点から、1-位及び2-位の基が同一であることが好ましい。

40

#### 【0030】

実用上十分なレベルにCTL活性を増強させる点から、リン脂質は不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基を有することが好ましい。アシル基の炭素数が13未満であると、リボソームの安定性が悪くなったり、またCTL活性増強効果が不十分になる場合がある。また、アシル基の炭素数が24を超えると、リボソームの安定性が悪くなる場合がある。

50

## 【0031】

不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有するリン脂質としては、酸性リン脂質、中性リン脂質、ペプチドを結合することのできる官能基を有する反応性リン脂質などの種類が挙げられる。これらは、種々の要求に応じて、その種類、割合を適宜選択することができる。

## 【0032】

酸性リン脂質としては、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ホスファチジリンイノシトール等を用いることができる。CTL活性を実用上十分なレベルに増強する点、及び工業的な供給性、医薬品として用いるための品質などの点から、不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基を有するジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジルグリセロール、ジアシルホスファチジン酸、及びジアシルホスファチジリンイノシトールが好ましく用いられる。酸性リン脂質は、リポソームの表面にアニオン性電離基を与えるので、リポソーム表面にマイナスのゼータ電位を付与する。このためリポソームは、電荷的な反発力を得、水性溶媒中で安定な製剤として存在できる。このように、酸性リン脂質は、水性溶媒中のリポソームの安定性を確保する点で重要である。

10

## 【0033】

中性リン脂質としては、例えば、ホスファチジルコリン等を用いることができる。本発明で用いることができる中性リン脂質は、CTL活性増強を達成する範囲において、その種類・量を適宜選択して用いることができる。中性リン脂質は、酸性リン脂質及びペプチドを結合したリン脂質に比べ、リポソームを安定化する機能が高く、膜の安定性を向上させ得る。かかる観点から、本発明のペプチド結合リポソームに用いられるリポソームは、中性リン脂質を含有することが好ましい。CTL活性増強効果を達成するために用いる酸性リン脂質、ペプチド結合のための反応性リン脂質及び安定化剤の含有量を確保した上で、中性リン脂質の使用量を決定できる。

20

## 【0034】

本発明のペプチドは、リポソームに含まれる不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有するリン脂質に結合することにより、リポソームの表面に結合する。このペプチドの結合のためのリン脂質として、ペプチドが結合することのできる官能基を有する反応性リン脂質が用いられる。不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有する反応性リン脂質は、種々の要求に応じて、その種類、割合が適宜選択される。前記リン脂質と同様に、反応性リン脂質においても、リン脂質に含まれる不飽和アシル基又は不飽和炭化水素基の炭素数が24を超えるか、14未満である場合は好ましくない。

30

## 【0035】

反応性リン脂質としては、ホスファチジルエタノールアミン又はその末端変性体が挙げられる。また、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジリンイノシトール及びこれらの末端変性体も反応性リン脂質として用いることができる。工業的な入手性、ペプチドとの結合工程の簡便性、収率などの点から、ホスファチジルエタノールアミン又はその末端変性体が好ましく用いられる。ホスファチジルエタノールアミンはその末端に抗体を結合することの出来るアミノ基を有する。更に、CTL活性を実用上十分なレベルに増強する点、リポソーム中での安定性、及び工業的な供給性、医薬品として用いるための品質などの点から、不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基を有するジアシルホスファチジルエタノールアミン又はその末端変性体が最も好ましく用いられる。

40

## 【0036】

ジアシルホスファチジルエタノールアミンは、例えば、ジアシルホスファチジルコリンを原料に、ホスホリパーゼDを用いてコリンとエタノールアミンを塩基交換反応させることで得ることができる。具体的には、ジアシルホスファチジルコリンを溶解したクロロホ

50



ルム溶液と、ホスホリパーゼD及びエタノールアミンを溶解した水を適宜比率において混合し粗反応物を得ることができる。粗反応物を、クロロホルム/メタノール/水系溶媒を用いてシリカゲルカラムで精製し目的のジアシルホスファチジルエタノールアミンを得ることができる。当業者であれば、溶媒組成比などのカラム精製条件を適宜選択して実施することが可能である。

#### 【0037】

末端変性体としては、ジアシルホスファチジルエタノールアミンのアミノ基に2価反応性化合物の一方の末端を結合させたジアシルホスファチジルエタノールアミン末端変性体が挙げられる。2価反応性化合物としては、ジアシルホスファチジルエタノールアミンのアミノ基と反応することができるアルデヒド基又はコハク酸イミド基を少なくとも片方の末端に有する化合物が利用できる。アルデヒド基を有する2価反応性化合物として、グリオキサール、グルタルアルデヒド、サクシンジアルデヒド、テレフタルアルデヒドなどが挙げられる。好ましくは、グルタルアルデヒドが挙げられる。コハク酸イミド基を有する2価反応性化合物として、ジチオビス(サクシイミジルプロピオネート)、エチレングリコール-ビス(サクシイミジルサクシネート)、ジサクシイミジルサクシネート、ジサクシイミジルスベレート、又はジサクシイミジルグルタレートなどが挙げられる。

10

#### 【0038】

また、一方の末端にサクシイミド基、他方の片末端にマレイミド基を有する2価反応性化合物として、N-サクシイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート、スルホサクシイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート、N-サクシイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)アセテート、N-サクシイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)プロピオネート、サクシイミジル-4-(N-マレイミドエチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート、スルホサクシイミジル-4-(N-マレイミドエチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート、N-( -マレイミドブチリルオキシ)サクシイミド、N-( -マレイミドカプロイルオキシ)サクシイミド等が挙げられる。このような2価反応性化合物を用いると、官能基としてマレイミド基を有するジアシルホスファチジルエタノールアミン末端変性体を得られる。以上のような2価反応性化合物の一方の末端の官能基をジアシルホスファチジルエタノールアミンのアミノ基に結合し、ジアシルホスファチジルエタノールアミン末端変性体を得ることができる。

20

30

#### 【0039】

リポソームの表面にペプチドを結合する方法としては、例えば、上記の反応性リン脂質を含有するリポソームを調製し、次にペプチドを加えてリポソーム中の反応性リン脂質にペプチドを結合する方法を挙げることができる。また、予めペプチドを反応性リン脂質に結合しておき、次に、得られたペプチド結合反応性リン脂質を、反応性リン脂質以外のリン脂質及び安定化剤と混合することによっても、ペプチドを表面に結合したリポソームを得ることが出来る。反応性リン脂質へのペプチドの結合方法は、当該技術分野において周知である。

#### 【0040】

本発明のペプチド結合リポソームに用いられるリポソームは、不飽和結合を1個有する炭素数14~24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14~24の炭化水素基を有するリン脂質を少なくとも1種、例えば2種以上、好ましくは3種以上含有する。例えば、本発明のペプチド結合リポソームに用いられるリポソームは、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジルグリセロール、ジアシルホスファチジン酸、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、サクシイミジル-ジアシルホスファチジルエタノールアミン、及びマレイミド-ジアシルホスファチジルエタノールアミンから選ばれる少なくとも1種、例えば2種以上、好ましくは3種以上の、不飽和結合を1個有する炭素数14~24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14~24の炭化水素基を有するリン脂質を含有する。

40

#### 【0041】

50

また、本発明のペプチド結合リボソームに用いられるリボソームは、不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有する酸性リン脂質、不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有する中性リン脂質、及び不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有する反応性リン脂質を、それぞれ、少なくとも1種含有することが好ましい。

【0042】

本発明において、リボソームの安定化剤としては、ステロール類やトコフェロール類を用いることができる。ステロール類としては、一般にステロール類として知られるものであればよく、例えば、コレステロール、シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロールなどが挙げられ、入手性などの点から、特に好ましくは、コレステロールが用いられる。トコフェロール類としては、一般にトコフェロールとして知られるものであればよく、例えば、入手性などの点から、市販の $\alpha$ -トコフェロールが好ましく挙げられる。

10

【0043】

さらに、本発明の効果を損なわない限り、本発明のペプチド結合リボソームに用いられるリボソームは、リボソームを構成することのできる、公知のリボソーム構成成分を含んでいてもよい。

20

【0044】

本発明のペプチド結合リボソームに用いられるリボソームの組成としては、例えば以下を挙げることができる：

(A) 不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有するリン脂質 1～99.8モル%；

(B) 安定化剤 0.2～75モル%。

【0045】

なお、各成分の含有量は、ペプチド結合リボソームの全構成成分に対するモル%として表示する。

【0046】

上記成分(A)の含有量は、リボソームの安定性の観点から、好ましくは10～90モル%、より好ましくは30～80モル%、更に好ましくは50～70モル%である。

30

【0047】

上記成分(B)の含有量は、リボソームの安定性の観点から、好ましくは5～70モル%、より好ましくは10～60モル%、更に好ましくは20～50モル%である。安定化剤の含有量が75モル%を越えるとリボソームの安定性が損なわれ好ましくない。

【0048】

上記成分(A)には、以下が含まれる：

(a) ペプチドが結合していない、不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有するリン脂質、及び

(b) ペプチドが結合した、不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有するリン脂質。

40

【0049】

上記成分(a)の含有量は、通常0.01～85モル%、好ましくは0.1～80モル%、より好ましくは0.1～60モル%、更に好ましくは0.1～50モル%である。

【0050】

上記成分(b)の含有量は、通常0.2～80モル%、好ましくは0.3～60モル%、より好ましくは0.4～50モル%、更に好ましくは0.5～25モル%である。含有量が0.2モル%未満であると、ペプチド量が低下するため、実用上十分なレベルにCTLを活性化することが困難となり、80モル%を超えると、リボソームの安定性が低下す

50

る。

【0051】

上記成分(a)のリン脂質には、通常、上述の酸性リン脂質及び中性リン脂質が含まれる。また、上記成分(b)のリン脂質には、上述の反応性リン脂質が含まれる。

【0052】

酸性リン脂質の含有量は、通常1～85モル%、好ましくは2～80モル%、より好ましくは4～60モル%、更に好ましくは5～40モル%である。含有量が1モル%未満であると、ゼータ電位が小さくなりリポソームの安定性が低くなり、また、実用上十分なレベルにCTLを活性化することが困難となる。一方、含有量が85モル%を超えると、結果として、リポソーム中のペプチド結合リン脂質の含有量が低下し、実用上十分なレベルにCTLを活性化することが困難となる。

10

【0053】

中性リン脂質の含有量は、通常0.01～80モル%、好ましくは0.1～70モル%、より好ましくは0.1～60モル%、更に好ましくは0.1～50モル%である。含有量が80.0モル%を超えると、リポソーム中に含まれる酸性リン脂質、ペプチド結合リン脂質及びリポソームの安定化剤の含有量が低下し、実用上十分なレベルにCTLを活性化することが困難となる。

【0054】

ペプチドが結合したリン脂質は、前記の反応性リン脂質にペプチドが結合して得られるもので、反応性リン脂質がペプチドと結合する割合は、本発明の効果を妨げない範囲において、結合に用いる官能基の種類、結合処理条件等を適宜実施して選択することができる。例えば、ジアシルホスファチジルエタノールアミンの末端アミノ基に2価反応性化合物であるジサクシンイミジルサクシネートの片末端を結合して得たジアシルホスファチジルエタノールアミンの末端変性体を反応性リン脂質として用いる場合、結合処理諸条件の選択によって反応性リン脂質の10～99%をペプチドと結合することができる。この場合、ペプチドと結合していない反応性リン脂質は、酸性リン脂質となってリポソーム中に含有される。

20

【0055】

本発明のペプチド結合リポソームの好ましい態様としては、以下の組成を挙げることが出来る：

30

(I) 不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有する酸性リン脂質 1～85モル%；

(II) 不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有する中性リン脂質 0.01～80モル%；

(III) 上記ペプチドから選択される少なくとも1種が結合した、不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有するリン脂質 0.2～80モル%；

(IV) 安定化剤 0.2～75モル%。

(合計 100モル%)

【0056】

本発明のペプチド結合リポソームに用いられるリポソームのより好ましい態様としては、以下の組成を挙げることが出来る：

40

上記成分(I) 2～80モル%

上記成分(II) 0.1～70モル%

上記成分(III) 0.3～60モル%

上記成分(IV) 10～70モル%

(合計 100モル%)

【0057】

本発明のペプチド結合リポソームに用いられるリポソームの更に好ましい態様としては、以下の組成を挙げることが出来る：

50

上記成分 ( I ) 4 ~ 6 0 モル %  
 上記成分 ( I I ) 0 . 1 ~ 6 0 モル %  
 上記成分 ( I I I ) 0 . 4 ~ 5 0 モル %  
 上記成分 ( I V ) 2 0 ~ 6 0 モル %  
 ( 合計 1 0 0 モル % )

【 0 0 5 8 】

本発明のペプチド結合リポソームに用いられるリポソームのとりわけ好ましい態様としては、以下の組成を挙げることが出来る：

上記成分 ( I ) 5 ~ 4 0 モル %  
 上記成分 ( I I ) 0 . 1 ~ 5 0 モル %  
 上記成分 ( I I I ) 0 . 5 ~ 2 5 モル %  
 上記成分 ( I V ) 2 5 ~ 5 5 モル %  
 ( 合計 1 0 0 モル % )

10

【 0 0 5 9 】

本発明のペプチド結合リポソームに用いられるリポソーム中のリン脂質に含まれる不飽和アシル基又は不飽和炭化水素基の炭素数が 1 4 ~ 2 4 であることを特徴とするが、本発明の効果を妨げない範囲で、炭素数が 1 4 未満又は 2 4 を超える不飽和アシル基又は不飽和炭化水素基を含むリン脂質を含んでいても差支えない。本発明のペプチド結合リポソームに用いられるリポソーム中のリン脂質に含まれる全ての不飽和アシル基又は不飽和炭化水素基の合計数に対して、炭素数が 1 4 ~ 2 4 である不飽和アシル基又は不飽和炭化水素基の数の割合は、例えば 5 0 % 以上、好ましくは 6 0 % 以上、より好ましくは 7 5 % 以上、更に好ましくは 9 0 % 以上、最も好ましくは 9 7 % 以上 ( 例えば実質的に 1 0 0 % ) である。

20

【 0 0 6 0 】

本発明のペプチド結合リポソームに用いられるリポソームは、本発明の効果を妨げない限り、炭素数が 1 4 ~ 2 4 の範囲のアシル基又は炭化水素基を有する、リン脂質以外の脂質を含んでもよい。該脂質の含有量は、通常は 4 0 モル % 以下であり、好ましくは 2 0 モル % 以下、より好ましくは 1 0 モル % 以下、更に好ましくは 5 モル % 以下 ( 例えば実質的に 0 モル % ) である。

【 0 0 6 1 】

本発明に用いられるリポソームは、構成成分であるリン脂質、反応性リン脂質、安定化剤、ペプチド等を用い、適宜配合や加工を行い、これを適当な溶媒に添加するなどの方法で得ることができる。例えば、エクスツルージョン法、ボルテックスマキサー法、超音波法、界面活性剤除去法、逆相蒸発法、エタノール注入法、プレベシクル法、フレンチプレス法、W / O / W エマルジョン法、アニーリング法、凍結融解法などの製造方法が挙げられる。リポソームの粒径は特に限定されるものではないが、保存安定性などの点から、粒径は 2 0 ~ 6 0 0 n m が挙げられ、好ましくは 3 0 ~ 5 0 0 n m 、次に好ましくは 4 0 ~ 4 0 0 n m であり、更に好ましくは、 5 0 ~ 3 0 0 n m であり、最も好ましくは 7 0 ~ 2 3 0 n m である。

30

【 0 0 6 2 】

なお、本発明においては、リポソームの物理化学的安定性を向上させるために、リポソーム調製過程又は調製後に、リポソームの内水相及び / 又は外水相に、糖類又は多価アルコール類を添加しても良い。特に、長期保存あるいは製剤化途上での保管が必要な場合には、リポソームの保護剤として、糖あるいは多価アルコールを添加・溶解し、凍結乾燥により水分を除いてリン脂質組成物の凍結乾燥物とすることが好ましい。

40

【 0 0 6 3 】

糖類としては、例えばグルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、イノシトール、リボース、キシロース等の単糖類；サッカロース、ラクトース、セロビオース、トレハロース、マルトース等の二糖類；ラフィノース、メレジトース等の三糖類；シクロデキストリン等のオリゴ糖；デキストリン等の多糖類；キシリトール、ソルビトール、マ

50

ンニトール、マルチトール等の糖アルコールなどが挙げられる。これらの糖類の中では単糖類又は二糖類が好ましく、中でもグルコース又はサッカロースが入手性などの点からより好ましく挙げられる。

#### 【0064】

多価アルコール類としては、例えば、グリセリン、ジグリセリン、トリグリセリン、テトラグリセリン、ペンタグリセリン、ヘキサグリセリン、ヘプタグリセリン、オクタグリセリン、ノナグリセリン、デカグリセリン、ポリグリセリンなどのグリセリン系化合物；ソルビトール、マンニトールなどの糖アルコール系化合物；エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラエチレングリコール、ペンタエチレングリコール、ヘキサエチレングリコール、ヘプタエチレングリコール、オクタエチレングリコール、ノナエチレングリコールなどが挙げられる。このうち、グリセリン、ジグリセリン、トリグリセリン、ソルビトール、マンニトール、分子量400～10,000のポリエチレングリコールが入手性の点から好ましく挙げられる。リポソームの内水相及び/又は外水相に含ませる、糖類あるいは多価アルコール類の濃度は、リポソーム液に対する重量濃度で、例えば1～20重量%が挙げられ、好ましくは2～10重量%が挙げられる。

10

#### 【0065】

本発明のペプチド結合リポソームを製造する場合、ペプチドを結合させる前のリポソームを作製した後、ペプチドを結合させることにより簡便にペプチド結合リポソームを得ることができる。例えば、リン脂質、安定化剤及び膜表面にペプチドを結合するための反応性リン脂質を含有したリポソーム、例えばリポソーム液を調製し、その外水相に前記の糖類の一つであるスクロースを2～10重量%程度加えて溶解する。この糖添加製剤を10mlガラス製バイアルに移して棚段式凍結乾燥機内に置き、-40℃等に冷却して試料を凍結した後、常法により凍結乾燥物を得る。ここで得たリポソームの凍結乾燥物は、水分が取り除かれているため長期の保存が可能であり、必要時に特定のペプチドを加えて後の工程を実施することにより、本発明のペプチド結合リポソームを簡便に迅速に得ることができる。ペプチドとリポソームの相互作用が強く不安定性が強い場合などは、このようにリポソームの凍結乾燥物の段階で保存し、必要な際にペプチドを結合して用いると非常に簡便である。

20

#### 【0066】

本発明のペプチド結合リポソームに用いられるリポソームは、ペプチドが結合したリン脂質を有し得る。ペプチドが結合したリン脂質を含有するリポソームを得る方法としては、次の(A)及び(B)による方法が挙げられる。

30

(A)リン脂質、反応性リン脂質、安定化剤を含有するリポソームを調製し、これにペプチド及び2価反応性化合物を添加し、リポソーム中に含有される反応性リン脂質の官能基と、ペプチドの官能基とを、2価反応性化合物を介して連結する。ここで用いることができる2価反応性化合物は、反応性リン脂質の末端変性体調製において用いたものを同様に用いることができる。具体的には、アルデヒド基を有する2価反応性化合物として、グリオキサール、グルタルアルデヒド、サクシンジアルデヒド、テレフタルアルデヒドなどが挙げられる。好ましくは、グルタルアルデヒドが挙げられる。更に、コハク酸イミド基を有する2価反応性化合物として、ジチオビス(サクシンイミジルプロピオネート)、エチレングリコール-ビス(サクシンイミジルサクシネート)、ジサクシンイミジルサクシネート、ジサクシンイミジルスベレート、又はジサクシンイミジルグルタレートなどが挙げられる。また、片末端にサクシンイミド基、もう一方の片末端にマレイミド基を有する2価反応性化合物として、N-サクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート、スルホサクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート、N-サクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)アセテート、N-サクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)プロピオネート、サクシンイミジル-4-(N-マレイミドエチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート、スルホサクシンイミジル-4-(N-マレイミドエチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート、N-( -マレイミ

40

50

ドブチリルオキシ)サクシンイミド、N-( -マレイミドカプロイルオキシ)サクシンイミド等を使用することが出来る。かかる2価反応性化合物を使用すると、官能基としてマレイミド基を有する反応性リン脂質(例えばホスファチジルエタノールアミン)の末端変性体が得られる。

(B)リン脂質、反応性リン脂質、安定化剤を含有するリポソームを調製し、これにペプチドを添加し、リポソームに含まれる反応性リン脂質の官能基と、ペプチドの官能基を連結して結合させる方法。

【0067】

前記(A)及び(B)における結合の種類としては、例えば、イオン結合、疎水結合、共有結合等が挙げられるが、好ましくは共有結合である。更に共有結合の具体例としては、シッフ塩基結合、アミド結合、チオエーテル結合、エステル結合などが挙げられる。以上の2つの方法いずれとも、リポソームに含まれる反応性リン脂質にペプチドを結合することができ、リポソーム中にペプチドを結合したリン脂質が形成される。

10

【0068】

前記の(A)の方法において、原料となるリポソームとペプチドとを2価反応性化合物を介して結合させる方法の具体例としては、例えば、シッフ塩基結合を利用する方法が挙げられる。シッフ塩基結合を介してリポソームとペプチドとを結合する方法としては、アミノ基を表面に有するリポソームを調製し、ペプチドをリポソームの懸濁液に添加し、次に、2価反応性化合物としてジアルデヒドを加え、リポソーム表面のアミノ基とペプチド中のアミノ基とをシッフ塩基を解して結合する方法を挙げることができる。

20

【0069】

この結合手順の具体例としては、例えば、次の方法が挙げられる。

(A-1)アミノ基を表面に有するリポソームを得るために、不飽和結合を1個有する炭素数14~24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14~24の炭化水素基を有する反応性リン脂質(例えば、ホスファチジルエタノールアミン)をリポソーム原料脂質(リン脂質、リポソームの安定化剤等)中に混合して、アミノ基がリポソーム表面に所定量存在するリポソームを作成する。

(A-2)前記リポソーム懸濁液に、ペプチドを添加する。

(A-3)次に、2価反応性化合物としてグルタルアルデヒドを加えて、所定の時間反応させてリポソームとペプチドとの間にシッフ塩基結合を形成する。

30

(A-4)その後、余剰のグルタルアルデヒドの反応性を失活させるため、アミノ基含有水溶性化合物としてグリシンをリポソーム懸濁液に加えて反応させる。

(A-5)ゲルろ過、透析、限外ろ過、遠心分離などの方法により、リポソームに未結合のペプチド、グルタルアルデヒドとグリシンとの反応産物、及び余剰のグリシンを除去して、ペプチド結合リポソーム懸濁液を得る。

【0070】

前記の(B)の方法の具体例としては、アミド結合、チオエーテル結合、シッフ塩基結合、エステル結合などを形成することのできる官能基を有する反応性リン脂質をリン脂質膜に導入する方法が挙げられる。このような官能基の具体例としては、サクシンイミド基、マレイミド基、アミノ基、イミノ基、カルボキシル基、水酸基、チオール基などが挙げられる。リポソームに導入する反応性リン脂質の例としては、前記の不飽和結合を1個有する炭素数14~24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14~24の炭化水素基を有する反応性リン脂質(例えば、ホスファチジルエタノールアミン)のアミノ基末端の末端変性物を用いることができる。

40

【0071】

この結合手順の具体例として、ジアシルホスファチジルエタノールアミンを用いた場合を例にとって、以下説明する。

(B-1)不飽和結合を1個有する炭素数14~24のアシル基を有するジアシルホスファチジルエタノールアミンとジサクシンイミジルサクシネートを公知の方法で片末端のみ反応させて、官能基としてサクシンイミド基を末端に有するジサクシンイミジルサクシネ

50

ート結合ジアシルホスファチジルエタノールアミンを得る。

(B-2) 前記ジサクシンイミジルサクシネート結合ジアシルホスファチジルエタノールアミンと他のリポソーム構成成分(リン脂質、安定化剤等)とを公知の方法で混合し、表面に官能基としてサクシンイミド基を有するリポソーム組成物を作成する。

(B-3) 前記リポソーム組成物懸濁液に、ペプチドを加え、ペプチド中のアミノ基と、リン脂質膜表面のサクシンイミド基とを反応させる。

(B-4) 未反応のペプチド、反応副生物等を、ゲルろ過、透析、限外ろ過、遠心分離などの方法により除去して、ペプチド結合リン脂質を含有するリポソーム懸濁液を得る。

#### 【0072】

リポソームとペプチドとを結合する場合、官能基として含有されることが多いアミノ基又はチオール基を対象とすることが実用上好ましい。アミノ基を対象とする場合には、サクシンイミド基と反応させることによりシッフ塩基結合を形成させることが出来る。チオール基を対象とする場合には、マレイミド基と反応させることによりチオエーテル結合を形成させることが出来る。

#### 【0073】

本発明における抗原提示細胞は、細胞表面抗原HLA-A2を発現する細胞を*in vitro*において1種又は2種以上のペプチドと接触させることにより調製された細胞である。細胞は、自己由来及び/又は同種由来の細胞であることが好ましい。また、細胞としては、細胞表面抗原HLA-A2(例えば、HLA-A\*0201)を発現する細胞が挙げられる。好ましいものは、リンパ系単核細胞(T細胞、マクロファージ、B細胞、樹状細胞など)であり、さらに好ましくは、樹状細胞である。

#### 【0074】

本発明の抗原提示細胞は、対象に投与(注入)することによって、SARSコロナウイルス特異的なHLA-A2拘束性CTLの誘導剤、及び/又は、SARSコロナウイルスの感染を治療又は予防するためのワクチンとして使用することができる。すなわち本発明の抗原提示細胞は本発明のペプチドを細胞表面に提示するものであり、CTLを強く誘導することができることから、SARSコロナウイルスの排除を目的としたCTL誘導剤及び/又はワクチンとして使用することができる。抗原提示細胞は細胞数 $10^7$ あたり、好ましくは $1 \sim 100 \mu\text{M}$ 、より好ましくは $5 \sim 50 \mu\text{M}$ 、例えば、 $10 \mu\text{M}$ のペプチドを用いて調製したものであることが好ましい。

#### 【0075】

本発明のペプチド、ペプチド結合リポソーム及び抗原提示細胞は、SARSコロナウイルス特異的なHLA-A2拘束性CTLの誘導剤、及び/又は、SARSコロナウイルスの感染を治療又は予防するためのワクチンとして用いることができる。対象はヒトを含めた任意の動物であってよい。特定の実施形態では、対象はヒトである。本発明の誘導剤及び/又はワクチンは、有効成分とされる物質の性状に応じた一般的な医薬組成物の形態とし、組成物の直接送達は、一般に非経口的注射(例えば、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、筋肉内注射、組織の間隙の空間への注射等)によって達成される。他の投与方法としては、粘膜投与(例えば、経口、経鼻、また肺)、眼を通じた投与、経皮的投与及び坐剤が挙げられる。

#### 【0076】

すなわち、非経口的に投与する場合には、注射剤、経鼻剤、局所投与剤(経皮剤等)、直腸投与剤等の投与形態で投与することができる。経口的に投与する場合、通常当分野で用いられる投与形態で投与することができる。注射剤としては、例えば無菌の溶液又は懸濁液、乳剤等が挙げられ、具体的には水、水-プロピレングリコール溶液、緩衝化液、0.4%の生理食塩水等が挙げられる。さらに液状製剤とした場合は凍結保存、又は、凍結乾燥等により水分を除去して保存することができる。凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水などを加え、再溶解して使用される。局所投与剤としては、例えばクリーム、軟膏、ローション、経皮剤等が挙げられる。経口剤又は直腸投与剤としては、例えばカプセル、錠剤、ピル、散剤、ドロップ、座剤、液剤等が挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【0077】

以上の剤形は通常当分野で行われている手法により、薬学的に許容される賦形剤、添加剤と共に製剤化される。薬学的に許容される賦形剤、添加剤としては、担体、結合剤、香料、緩衝剤、増粘剤、着色剤、安定剤、乳化剤、分散剤、懸濁化剤、防腐剤、pH調節剤、張度調節剤、浸潤剤等が挙げられる。また、薬学的に許容される担体としては、例えば炭酸マグネシウム、ラクトース、ペクチン、澱粉、メチルセルロース等が挙げられる。

## 【0078】

本発明のペプチド、ペプチド結合リポソーム又は抗原提示細胞を有効成分として含有する誘導剤、並びに、本発明のペプチド、ペプチド結合リポソーム又は抗原提示細胞を有効成分として含有するワクチンは、その効果を増強するため、アジュバンドをさらに含有してもよい。アジュバンドとしては、水酸化アルミニウムゲル、完全フロイントアジュバンド、不完全フロイントアジュバンド、百日咳菌アジュバンド、ポリ(I, C)、CpG-DNA等が挙げられる。中でも、CpG-DNAが好ましい。CpG-DNAは、非メチル化CpGモチーフを含むDNAであり、樹状細胞を活性化することにより、本発明のペプチド、ペプチド結合リポソーム又は抗原提示細胞によるCTL誘導を増強することができる。

10

## 【0079】

製剤中の本発明のペプチドの投与量、製剤の投与回数は症状、年齢、体重、投与形態等によって異なるが、通常 $0.01 \mu\text{g} \sim 1 \text{mg}$ 、好ましくは $0.1 \mu\text{g} \sim 500 \mu\text{g}$ 、より好ましくは $1.0 \mu\text{g} \sim 100 \mu\text{g}$ であり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。例えば、初期免疫（すなわち、治療的又は予防的投与）では成人患者に関して $1.0 \mu\text{g} \sim 500 \mu\text{g}$ のペプチドを投与し、患者の血液における特異的なCTL活性の測定による患者の応答及び状態に応じて、数週間から数ヶ月にわたるブースティング療法に従う $1.0 \mu\text{g} \sim 100 \mu\text{g}$ のペプチドのブースティング投与がそれに続く。また、本発明の抗原提示細胞の投与細胞数は、好ましくは $10^9 \sim 10^6$ 個、より好ましくは $10^8 \sim 10^7$ 個であるが、症状、年齢、体重、投与形態等により適宜調整することができる。

20

## 【実施例】

## 【0080】

以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に制限するものではない。

30

## 【0081】

（実施例1：CTLエピトープの予測）

2種類のエピトープ予測コンピュータソフトBIMAS（URL：[http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)）及びSYFPEITHI（URL：<http://www.syfpeithi.de/>）を用いて、pp1aのエピトープ候補を検索した。HLA分子：HLA-A\*0201、及び、ペプチド長：9～10アミノ酸残基を対象として検索した中から、2種類の解析方法の両方において高い予測スコアを示すエピトープ候補ペプチドを30種類選抜した。これら30種類のエピトープ候補ペプチドのアミノ酸配列を表1に示す。30種類のエピトープ候補ペプチドについて、それぞれ合成ペプチドを作製し、実際にエピトープとして機能し得るペプチドを検索し、同定した9種類のエピトープペプチドの機能をさらに解析するために以下の実施例1～6を行った。

40

## 【0082】



【表 1】

Epitope	Sequence	SEQ ID No:	BIMAS	SYFPEITHI
1) pp1a-15	QLSLPVLQV	1	160.0	26
2) pp1a-103	TLGVLVPHV	2	160.0	26
3) pp1a-445	TLNEDLLEI	3	98.4	28
4) pp1a-634	KLSAGVEFL	4	463.5	27
5) pp1a-651	FLITGVFDI	5	640.2	27
6) pp1a-1121	ILLAPLLSA	6	71.9	26
7) pp1a-1139	SLQVCVQTV	7	160.0	28
8) pp1a-1288	MLSRALKKV	8	272.0	25
9) pp1a-1652	YLSSVLLAL	9	226.0	28
10) pp1a-2187	CLDAGINYV	10	351.9	27
11) pp1a-2207	AMWLLLLSI	11	143.8	27
12) pp1a-2340	WLMWFIISI	12	1551.9	26
13) pp1a-2546	ILLLDQVLV	13	437.5	26
14) pp1a-2754	TLLCVLAAL	14	181.8	29
15) pp1a-2755	LLCVLAALV	15	118.2	25
16) pp1a-2758	VLAALVCYI	16	224.4	26
17) pp1a-2990	ALSGVFCGV	17	132.1	25
18) pp1a-3444	VLAWLYAAV	18	177.4	27
19) pp1a-3459	FLNRFTTTL	19	373.4	27
20) pp1a-3560	MLLTFLTSL	20	1174.4	29
21) pp1a-3564	FLTSLILV	21	735.9	25
22) pp1a-3616	FLLPSLATV	22	2722.7	33
23) pp1a-3687	TLMNVITLV	23	591.9	25
24) pp1a-3709	SMWALVISV	24	958.9	28
25) pp1a-3730	FLARAIVFV	25	4047.2	29
26) pp1a-3745	LLFITGNTL	26	134.4	26
27) pp1a-3816	KLNIKLLGI	27	84.0	27
28) pp1a-3848	VLLSVLQQL	28	309.1	27
29) pp1a-4071	ALWEIQQVV	29	970.0	25
30) pp1a-4219	VLGSLAATV	30	118.2	26

## 【 0 0 8 3 】

( 実施例 2 : ペプチドの H L A - A \* 0 2 0 1 分子への結合アフィニティの測定 )

表 1 に挙げた 3 0 種類のエピトープ候補ペプチドについて、主要組織適合抗原複合体 ( major histocompatibility complex、MHC ) クラス I 分子である H L A - A \* 0 2 0 1 への結合アフィニティを測定した。測定には、ヒトリンパ球系細胞株である T 2 細胞を用いた。T 2 細胞は、T A P 遺伝子の欠失により自己抗原由来の自己ペプチドが輸送できないため、ペプチドを結合しない H L A - A \* 0 2 0 1 を細胞表面に発現する。細胞外部に添加したペプチドが H L A - A \* 0 2 0 1 に結合する

10

20

30

40

50

と、HLA-A\*0201複合体を形成し、安定化する。この原理を利用し、形成されたHLA-A\*0201複合体量と添加したペプチドの濃度との関係から結合アフィニティを算出した。HLA-A\*0201複合体を検出する抗体として、抗HLA-A2モノクローナル抗体BB7.2(ATCC)を用いた。また、C型肝炎ウイルスのエピトープ(NS3-1585)をコントロールとして用いた。

【0084】

具体的には、T2細胞を種々の濃度のペプチドと共に37℃で一晩インキュベーションした。その後、抗HLA-A2抗体BB7.2と反応させ、次に、FITC標識した二次抗体を反応させた細胞をフローサイトメトリーにより解析した。NS3-1585をパルスしたT2細胞の平均蛍光強度(MFI)を基準(100%)とし、それぞれのペプチドについて50%の平均蛍光強度を示すペプチド濃度をBL<sub>50</sub>(half-maximal binding level)として表2に示した。BL<sub>50</sub>が100μM未満、100~200μM、及び、200μMよりも高い場合をそれぞれ結合アフィニティが“High”、“Medium”、及び、“Low”の3段階に分類したところ、高い結合アフィニティを示すペプチドが24種類存在した。

【0085】

【表 2】

Epitope	SEQ ID No:	BL <sub>50</sub> (μ M)	Affinity
1) pp1a-15	1	75.7	High
2) pp1a-103	2	3.1	High
3) pp1a-445	3	19.2	High
4) pp1a-634	4	59.8	High
5) pp1a-651	5	8.4	High
6) pp1a-1121	6	40.3	High
7) pp1a-1139	7	4.9	High
8) pp1a-1288	8	65.1	High
9) pp1a-1652	9	6.7	High
10) pp1a-2187	10	3.0	High
11) pp1a-2207	11	323.0	Low
12) pp1a-2340	12	2432.8	Low
13) pp1a-2546	13	7.6	High
14) pp1a-2754	14	96.7	High
15) pp1a-2755	15	187.2	Medium
16) pp1a-2758	16	97.3	High
17) pp1a-2990	17	6.2	High
18) pp1a-3444	18	53.0	High
19) pp1a-3459	19	39.6	High
20) pp1a-3560	20	47.1	High
21) pp1a-3564	21	100.4	Medium
22) pp1a-3616	22	31.8	High
23) pp1a-3687	23	22.8	High
24) pp1a-3709	24	6.4	High
25) pp1a-3730	25	25.7	High
26) pp1a-3745	26	153.7	Medium
27) pp1a-3816	27	68.1	High
28) pp1a-3848	28	102.5	Medium
29) pp1a-4071	29	8.3	High
30) pp1a-4219	30	53.3	High

10

20

30

40

## 【 0 0 8 6 】

(実施例 3 : ペプチドをパルスした抗原提示細胞を用いて免疫したマウスにおけるペプチド特異的 CTL の誘導)

表 1 に挙げた 30 種類のエピトープ候補ペプチドについて、ペプチド特異的に CTL が誘導されるか否かを調べるため、*in vitro* にてペプチドをパルスしたマウス脾臓細胞でマウスに免疫し、その脾臓細胞をペプチドで刺激した後、CTL 誘導活性を測定した。マウスには、マウス MHC クラス I と 2 - マイクログロブリン( 2 - m) をノックアウトしたマウスにヒト MHC クラス I の一つである HLA - A \* 0 2 0 1 とヒト 2 -

50

m遺伝子を導入したHLA-A2トランスジェニックマウス(HDD IIマウス、パスツール研究所、フランス; Dr. F. Lemonnierより供与された)を用いた。CD8陽性細胞においてインターフェロン(IFN-)産生が亢進した細胞の割合を指標として、CTL誘導活性を測定した。

【0087】

ナイーブなHLA-A2トランスジェニックマウスから調製した脾臓細胞を、*in vitro*にて各ペプチド10 $\mu$ Mと共に37 $^{\circ}$ C、1時間インキュベートした。ペプチドでパルスした脾臓細胞を別個体のナイーブなHLA-A2トランスジェニックマウスに静脈注射して免疫した。

【0088】

免疫1週間後、免疫したマウスから脾臓細胞を調製し、10%ウシ胎児血清(FCS)を含む培地に懸濁して、96ウェルプレートの1ウェル当たりの細胞数が2 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞となるように撒いた。そして、それぞれのウェルに各ペプチド(終濃度10 $\mu$ M)と、25倍希釈したGolgi Plus<sup>TM</sup>溶液(日本BD)を5 $\mu$ Lとを添加して37 $^{\circ}$ C、5時間インキュベートした。ここで、Golgi Plus<sup>TM</sup>は、細胞内の輸送をとめることで、産生したIFN-の分泌を阻害するために用いた。細胞を洗浄後、細胞表面のFc受容体をブロックすることにより非特異的応答を抑えるために、100 $\mu$ LのFACSバッファー(2%FCS及び0.1%アジ化ナトリウムを含むPBS)に懸濁した10<sup>6</sup>細胞当たり1 $\mu$ gのFcBlock抗体(日本BD)を添加し、4 $^{\circ}$ C、10分間インキュベートした。

【0089】

次に、CD8陽性細胞検出のため、細胞懸濁液にフルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識抗CD8抗体を0.5 $\mu$ g添加し、4 $^{\circ}$ C、30分間インキュベートした後、細胞を2回洗浄して染色した。更に、細胞内サイトカイン染色(ICStaining)を用いて、次の手順で細胞内のIFN-を染色した。まず、細胞を1ウェル当たり100 $\mu$ LのCytofix/Cytoperm<sup>TM</sup>溶液(日本BD)を添加し、4 $^{\circ}$ C、20分間静置して細胞を固定、細胞膜を浸透化した。細胞を2回洗浄した後に回収した。次に、フィコエリスリン(PE)標識抗IFN-抗体を0.5 $\mu$ g添加し、4 $^{\circ}$ C、30分間インキュベートした。細胞を洗浄後、100 $\mu$ LのFACSfixバッファー(2%FCS、0.1%アジ化ナトリウム及び1%ホルムアルデヒドを含むPBS)に懸濁し、フローサイトメトリー解析に呈した。

【0090】

それぞれのエピトープ候補ペプチドについて、CD8陽性細胞内IFN-陽性細胞の割合(%)を表3に示す。

【0091】

10

20

30

【表 3】

Epitope	SEQ ID No:	ICS (% in CD8+ cells)
1) pp1a-15	1	0.05
2) pp1a-103	2	0.07
3) pp1a-445	3	0.08
4) pp1a-634	4	0.08
5) pp1a-651	5	0.02
6) pp1a-1121	6	0.05
7) pp1a-1139	7	0.07
8) pp1a-1288	8	0.05
9) pp1a-1652	9	0.05
10) pp1a-2187	10	*0.19
11) pp1a-2207	11	*0.48
12) pp1a-2340	12	*0.21
13) pp1a-2546	13	*0.17
14) pp1a-2754	14	0.04
15) pp1a-2755	15	*0.18
16) pp1a-2758	16	0.03
17) pp1a-2990	17	*0.16
18) pp1a-3444	18	*0.12
19) pp1a-3459	19	0.03
20) pp1a-3560	20	0.04
21) pp1a-3564	21	0.06
22) pp1a-3616	22	0.07
23) pp1a-3687	23	*0.20
24) pp1a-3709	24	*0.50
25) pp1a-3730	25	0.06
26) pp1a-3745	26	0.03
27) pp1a-3816	27	0.07
28) pp1a-3848	28	0.07
29) pp1a-4071	29	0.06
30) pp1a-4219	30	0.01

10

20

30

40

\*:ICS 0.1%以上

## 【 0 0 9 2 】

その結果、30種類の候補ペプチドのうち、9種類のペプチド(pp1a-2187、pp1a-2207、pp1a-2340、pp1a-2546、pp1a-2755、pp1a-2990、pp1a-3444、pp1a-3687及びpp1a-3709；配列番号10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 23及び24)で、有意にCD8陽性細胞内IFN- $\gamma$ 陽性細胞を誘導したので、これら9種類のペプチドをエピトープと決定した。その中には、実施例2においてHLA-A\*0201への結合アフィニティ

50

が低いもの ( p p 1 a - 2 2 0 7 及び p p 1 a - 2 3 4 0 ) 及び中程度のもの ( p p 1 a - 2 7 5 5 ) が含まれていた。

【 0 0 9 3 】

( 実施例 4 : リポソーム及びペプチド結合リポソームの調整 )

実施例 3 において特に高い C T L 誘導活性を示した 9 種類の C T L エピトープペプチド ( p p 1 a - 2 1 8 7、 p p 1 a - 2 2 0 7、 p p 1 a - 2 3 4 0、 p p 1 a - 2 5 4 6、 p p 1 a - 2 7 5 5、 p p 1 a - 2 9 9 0、 p p 1 a - 3 4 4 4、 p p 1 a - 3 6 8 7 及び p p 1 a - 3 7 0 9 ; 配列番号 1 0 , 1 1 , 1 2 , 1 3 , 1 5 , 1 7 , 1 8 , 2 3 及び 2 4 ) について、以下の方法により、ペプチド結合リポソームを調製した。また、同様の方法で、ヘルパーペプチド ( アミノ酸配列 : T P P A Y R P P N A P I L ; 配列番号 3 2 ) を結合させたリポソームを調製した。なお、ヘルパーペプチドとして、 D r . A . S e t t e ら ( G l e n n Y e t a l . , J . I m m u n o l . 1 6 2 : 3 9 1 5 - 3 9 2 5 ( 1 9 9 9 ) 等 ) によって使用されている H B V c o r e 1 2 8 ヘルパーペプチドに基づき合成したもの ( O p e r o n 社 ) を用いた。

10

【 0 0 9 4 】

( 4 - 1 ) 末端変性ホスファチジルエタノールアミンからなる反応性リン脂質 ( サクシンイミジル基 - ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン ) の合成

ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン 2 g 及びトリエチルアミン 1 8 0  $\mu$  l をクロロホルム 5 0 m l に溶解及び添加し、 3 0 0 m l 容の 4 つ口フラスコに入れた。このフラスコをマグネットスターラーで室温で攪拌しつつ、別に調製した 2 価反応性化合物であるジサクシンイミジルスプレート 3 g をクロロホルム 8 0 m l に溶解した溶液を、常法に従って 4 時間にわたって滴下し、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンのアミノ基にジサクシンイミジルスプレートの片末端を反応させた。この粗反応溶液をナス型フラスコに移し、エバポレーターによって溶媒を留去した。次に、このフラスコに粗反応物を溶解できるだけのクロロホルムを少量加えて高濃度粗反応物溶液を得、クロロホルム / メタノール / 水 ( 6 5 / 2 5 / 1、体積比 ) で平衡化したシリカゲルを用いて常法に従ってカラムクロマトグラフィーを行い、目的のジオレオイルホスファチジルエタノールアミンのアミノ基にジサクシンイミジルスプレートの片末端が結合した画分のみを回収し、溶媒を留去して目的のサクシンイミジル基 - ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンを得た。

20

30

【 0 0 9 5 】

( 4 - 2 ) 脂質混合粉末の調製

ジオレオイルホスファチジルコリン 1 . 3 3 5 4 g ( 1 . 6 9 8 7 m m o l )、実施例 4 - 1 において調整したサクシンイミジル基 - ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン 0 . 2 8 8 6 g ( 0 . 2 8 3 1 m m o l )、コレステロール 0 . 7 6 6 3 g ( 1 . 9 8 1 8 m m o l ) 及びジオレオイルホスファチジルグリセロールナトリウム塩 0 . 4 5 1 3 g ( 0 . 5 6 6 2 m m o l ) をナス型フラスコに取り、クロロホルム / メタノール / 水 ( 6 5 / 2 5 / 4、体積比 ) 混合溶剤 5 0 m l を入れ、 4 0  $^{\circ}$  にて溶解した。次に、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下で溶剤を留去し、脂質の薄膜を作製した。さらに、注射用蒸留水を 3 0 m l 添加し、攪拌して均一のスラリーを得た。このスラリーを凍結させ、凍結乾燥機にて 2 4 時間乾燥させ脂質混合粉末を得た。

40

【 0 0 9 6 】

( 4 - 3 ) リポソームの調製

次に、別途作製した緩衝液 A ( 1 . 0 m M N a <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub> / K H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub>、 0 . 2 5 M サッカロース、 p H 7 . 4 ) 6 0 m l を上記脂質混合粉末の入ったナス型フラスコ内に入れ、 4 0  $^{\circ}$  にて攪拌しながら脂質を水和させ、リポソームを得た。次に、エクストルターを用いてリポソームの粒径を調整した。まず、 8  $\mu$  m のポリカーボネートフィルターを通過させ、続いて 5  $\mu$  m、 3  $\mu$  m、 1  $\mu$  m、 0 . 6 5  $\mu$  m、 0 . 4  $\mu$  m 及び 0 . 2  $\mu$  m の順にフィルターを通過させた。その結果、リポソーム粒子の平均粒径 2 0 6 n m ( 動的光散乱法による測定 ) が得られた。

50

## 【0097】

## (4-4) ペプチド結合リボソームの調製

実施例4-3において得られたリボソーム1.5mlを試験管に採取し、別に調製した3mlの各ペプチド溶液(1.25mM)/緩衝液Aを加えた後、5で48時間穏やかに攪拌し反応させた。この反応液を、緩衝液Aで平衡化したSephacrose CL-4Bを用いて常法に従ってゲル濾過した。なお、リボソーム画分は白濁しているため、目的画分は容易に認識できるが、UV検出器等で確認しても良い。ここで得られたリボソーム懸濁液中のリン濃度を測定し(リン脂質テスト、Wako)リン脂質由来のリン濃度を2mMとなるように緩衝液Aで希釈調整し、各ペプチド結合リボソームの懸濁液を得た。

## 【0098】

(実施例5: ペプチド結合リボソームを用いて免疫したマウスにおけるペプチド特異的CTLの誘導)

実施例3において特に高いCTL誘導活性を示した9種類のCTLEピトープペプチド(pp1a-2187、pp1a-2207、pp1a-2340、pp1a-2546、pp1a-2755、pp1a-2990、pp1a-3444、pp1a-3687及びpp1a-3709; 配列番号10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 23及び24)について、ペプチド結合リボソームを用いて免疫したマウスにおけるCTL誘導活性を測定した。

## 【0099】

実施例4において調製したペプチド結合リボソーム(25μl)、ヘルパーペプチド結合リボソーム(25μl)及びCpGモチーフをもつオリゴ核酸(5μg、塩基配列: 5'-tccatgacgttctgatggtt-3'; 配列番号33)を混合して得られた免疫溶液をナイーブなHLA-A2トランスジェニックマウスの足蹠(footpad)に免疫した。免疫後1週間飼育し、その後は実施例3と同じ方法によりCTL誘導活性を測定した。なお、コントロールとして、ペプチド結合リボソームの代わりにペプチドを結合していないリボソームを用いた。CpGモチーフをもつオリゴ核酸として、Nagata, T. et al., Vaccine 25: 4914-4921(2007)を基に、遺伝子合成したもの(北海道システムサイエンス株式会社)を用いた。

## 【0100】

ペプチド結合リボソームを用いて免疫したマウスにおけるフローサイトメトリーによるCD8とIFN-γの染色プロットを図1に示す。各グラフの右上枠内の各ドットが、CD8陽性細胞内IFN-γ陽性細胞に相当し、枠内の数値がCD8陽性細胞内IFN-γ陽性細胞の割合(%)を示す。その結果、含むペプチド結合リボソームを免疫することにより、CTL誘導が引き起こされることが分かった。

## 【0101】

## (比較例)

実施例5の比較対照実験として、以下の実験を行った。pp1aのCTLEピトープペプチドの代わりにSARS-CoVのスパイクタンパク質のCTLEピトープペプチド(spike-1203、アミノ酸配列: FIAGLIAIV; 配列番号34)を用い、ナイーブなHLA-A2トランスジェニックマウスの大腿筋への筋肉注射によって免疫したこと以外は、実施例4と同じ手法でCTL誘導活性を測定した。

## 【0102】

s spike-1203ペプチド結合リボソームを用いて免疫したマウスにおけるフローサイトメトリーによるCD8とIFN-γの染色プロットを図2に示す。解析の結果、これまでに知られているスパイクタンパク質のCTLEピトープペプチド(spike-1203)を用いた場合のCD8陽性細胞内IFN-γ陽性細胞の割合(%)は0.29であった。実施例4の結果と比較すると、pp1a由来の8種類のCTLEピトープペプチド(pp1a-2187、pp1a-2207、pp1a-2340、pp1a-2546、pp1a-2755、pp1a-2990、pp1a-3687及びpp1a-3709; 配列番号10, 11, 12, 13, 15, 17, 23及び24)が、スパイクタン

10

20

30

40

50

パク質のCTLエピトープペプチドよりも高いCTL誘導活性を示すことが分かった。

【0103】

(実施例6：ペプチド結合リボソームを使って免疫したマウスにおける *in vivo* CTLアッセイ)

実施例4において高いCTL誘導活性を示した5種類のCTLエピトープペプチド (pp1a-2187、pp1a-2340、pp1a-2755、pp1a-2990及びpp1a-3709；配列番号10, 12, 15, 17及び24) について、ペプチド結合リボソームを用いて免疫したマウスの *in vivo* におけるCTL応答活性を測定した。

【0104】

*in vivo* におけるCTL応答活性測定の原理は以下の通りである。ペプチドをパルスしていない標的細胞 (ネガティブコントロール) を低濃度の *carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE) で標識し、一方、ペプチドをパルスした標的細胞を高濃度 (10倍) のCFSEで標識する。2種類の細胞集団を同細胞数ずつ混ぜたものを、予めペプチド結合リボソームを用いて免疫したマウスに細胞移入する。その後、移入したマウスから脾臓細胞を回収して脾臓細胞懸濁液を調製し、フローサイトメトリー解析により、CFSE標識された移入細胞の比率を測定する。抗原ペプチドに対するCTL応答活性のないマウスでは等量のCFSE標識された移入細胞が回収される。しかしながら、抗原ペプチドに対するCTL応答活性を有するマウスでは、抗原ペプチドで覆われた標的細胞が溶解されるため、フローサイトメトリーによって高CFSE標識細胞の減少を定量することによって *in vivo* での溶解度合いを測定できる。

【0105】

具体的には、以下の手法により測定した。

予め、各ペプチドを用いて調製したペプチド結合リボソームをマウスに免疫し、ペプチド特異的CTLを誘導した移入用マウスを用意した。なお、コントロールとして、ペプチド結合リボソームの代わりにペプチドを結合していないリボソームで免疫したマウスを用いた。免疫の1週間後、別個体のナイーブマウスから脾臓細胞を調製し、RPMI-1640 (Sigma) 2mL当たりの細胞数が  $2 \times 10^8$  細胞となるように懸濁して、2本のチューブにそれぞれ1mLのアリコットを分取した。一方のチューブのみに終濃度  $10 \mu\text{M}$  となるようにペプチドを添加し、2本のチューブを37°C、1~2時間インキュベートした。細胞を1回洗浄した後、20mLのPBS/0.1%BSAに懸濁し、短時間ボルテックスした。その後、ペプチドをパルスした細胞のチューブに  $10 \mu\text{L}$  の5mM CFSEを添加し、すぐに、ペプチドとインキュベートしていない細胞のチューブに  $1 \mu\text{L}$  の5mM CFSEを添加して、両方のチューブをボルテックスにより懸濁し、37°Cのウォーターバスにて10分間インキュベートした。両方の細胞集団を遠心して1回洗浄し、生細胞数をカウントした上で、それぞれの細胞集団を  $5 \times 10^7$  細胞/mLとなるようにHBSSに懸濁した。各細胞懸濁液を等量ずつ混ぜて免疫溶液とし、予め免疫したマウスに細胞懸濁液  $200 \mu\text{L}$  ( $1 \times 10^7$  細胞/個体) を静脈注射することにより細胞移入した。移入から12時間後、マウスから脾臓細胞を回収し、脾臓1個当たり1mLのPBS/1%FBS/5mMEDTAに脾臓細胞を懸濁した。遠心後、1mLのFACS fixバッファーに懸濁し、この脾臓細胞懸濁液  $100 \mu\text{L}$  を2mLのFACSバッファーで希釈した後、フローサイトメトリー解析に呈した。

【0106】

CFSE標識された標的細胞を移入したマウスにおけるフローサイトメトリーによるCFSEの染色プロットを図3に示す。各グラフの一番右のピークがペプチドをパルスした細胞の集団を示し、右から二番目のピークがペプチドをパルスしていない細胞を示す。それぞれのCTLエピトープペプチドにおいて、リボソームを免疫したコントロール (左のグラフ) に比べ、ペプチド結合リボソームを免疫したもの (右のグラフ) では、ペプチドをパルスした細胞数が減少していることがわかった。CTLによる標的細胞のペプチド特

10

20

30

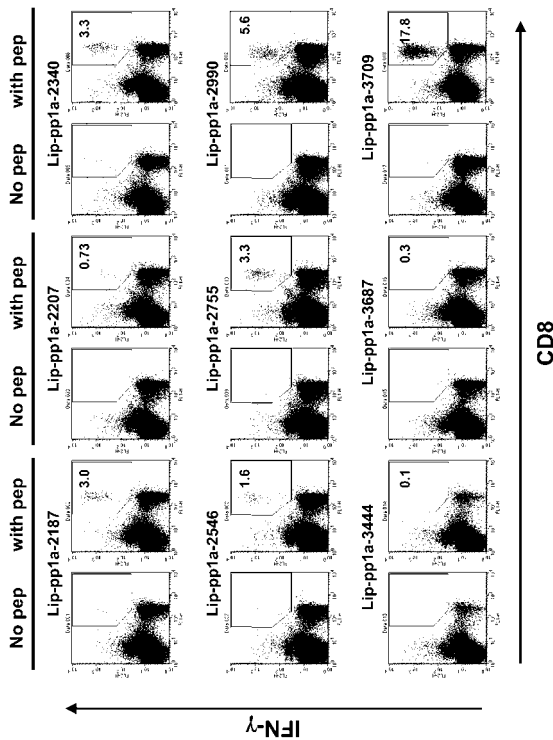
40

50

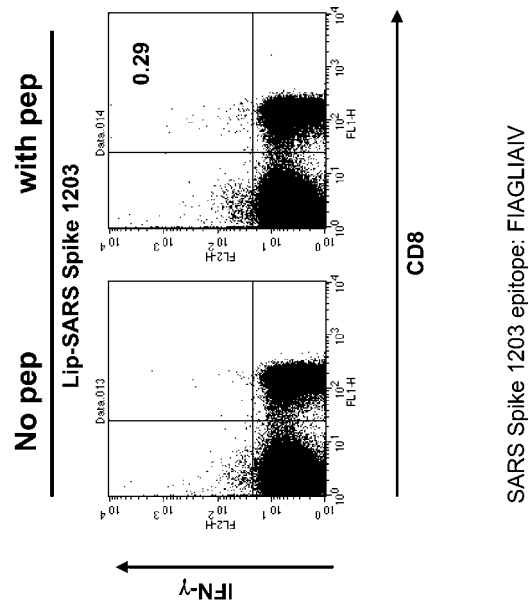


異的溶解率 (%) は、それぞれ pp1a-2187 : 79.2%、pp1a-2340 : 68.5%、pp1a-2755 : 70.5%、pp1a-2990 : 73.4% 及び pp1a-3709 : 96.3 であり、いずれも高い CTL 応答活性を持つことが明らかとなった。中でも、pp1a-3709 は特に高い CTL 応答活性を持つことが分かった。したがって、これらの CTL エピトープペプチド (pp1a-2187、pp1a-2340、pp1a-2755、pp1a-2990 及び pp1a-3709 ; 配列番号 10, 12, 15, 17 及び 24) は、CTL 応答活性の高いドミナントペプチドであることが明らかとなった。

【 図 1 】

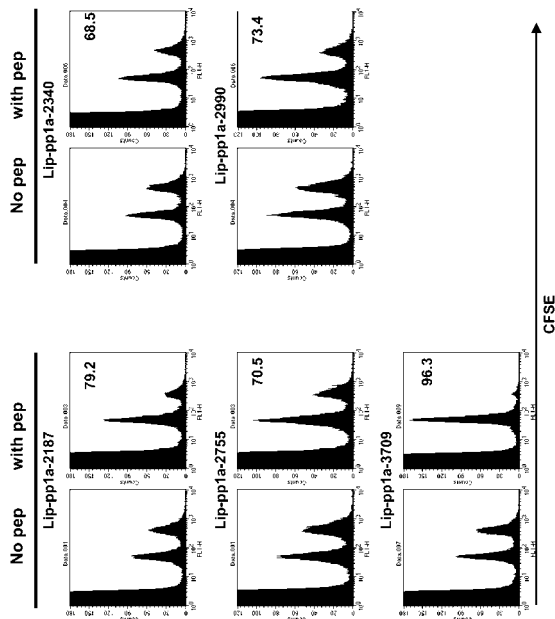


【 図 2 】



SARS Spike 1203 epitope: FIAGLIAIV

【 図 3 】



## 【 配列表 】

2010061919000001.app

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成23年6月1日(2011.6.1)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

## 【 特許請求の範囲 】

## 【 請求項 1 】

配列番号 2 4 , 1 0 , 1 1 , 1 2 , 1 3 , 1 5 , 1 7 , 1 8 及び 2 3 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチド。

## 【 請求項 2 】

ペプチドがリポソームの表面に結合しているペプチド結合リポソームであって、リポソームが、不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有するリン脂質、及び、安定化剤を含有し、ペプチドが、請求項1に記載のペプチドから選択される少なくとも1種である、ペプチド結合リポソーム。

## 【 請求項 3 】

前記リン脂質が、不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基を有するリン脂質である、請求項2に記載のペプチド結合リポソーム。

## 【 請求項 4 】

前記リン脂質が、オレオイル基を有するリン脂質である、請求項2に記載のペプチド結合リポソーム。

## 【請求項 5】

前記リン脂質が、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジルグリセロール、ジアシルホスファチジン酸、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、サクシンイミジル - ジアシルホスファチジルエタノールアミン、及び、マレイミド - ジアシルホスファチジルエタノールアミンから選ばれる少なくとも1つである、請求項 2 に記載のペプチド結合リポソーム。

## 【請求項 6】

前記安定化剤がコレステロールである、請求項 2 に記載のペプチド結合リポソーム。

## 【請求項 7】

請求項 1 に記載のペプチドから選択される少なくとも1種が、リポソームに含まれる不飽和結合を1個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有するリン脂質に結合している、請求項 2 に記載のペプチド結合リポソーム。

## 【請求項 8】

リポソームが以下の組成を有する、請求項 2 に記載のペプチド結合リポソーム：

(A) 不飽和結合を1個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有するリン脂質 1 ~ 99.8 モル%；

(B) 安定化剤 0.2 ~ 75 モル%。

## 【請求項 9】

以下の組成を有するペプチド結合リポソーム：

(I) 不飽和結合を1個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有する酸性リン脂質 1 ~ 85 モル%；

(II) 不飽和結合を1個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有する中性リン脂質 0.01 ~ 80 モル%；

(III) 請求項 1 に記載のペプチドから選択される少なくとも1種が結合した、不飽和結合を1個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有するリン脂質 0.2 ~ 80 モル%；

(IV) 安定化剤 0.2 ~ 75 モル%。

## 【請求項 10】

細胞表面抗原 H L A - A 2 を発現する細胞を *in vitro* において請求項 1 に記載のペプチドから選択される少なくとも1種と接触させることにより調製された抗原提示細胞。

## 【請求項 11】

前記細胞が自己由来である請求項 10 に記載の抗原提示細胞。

## 【請求項 12】

前記細胞が同種由来である請求項 10 に記載の抗原提示細胞。

## 【請求項 13】

請求項 1 に記載のペプチドから選択される少なくとも1種を有効成分として含有する、SARS コロナウイルス特異的な H L A - A 2 拘束性 C T L の誘導剤。

## 【請求項 14】

請求項 1 に記載のペプチドから選択される少なくとも1種を有効成分として含有する、SARS コロナウイルスの感染を予防するためのワクチン。

## 【請求項 15】

請求項 2 ~ 9 のいずれか一項に記載のペプチド結合リポソームを有効成分として含有する、SARS コロナウイルス特異的な H L A - A 2 拘束性 C T L の誘導剤。

## 【請求項 16】

請求項 2 ~ 9 のいずれか一項に記載のペプチド結合リポソームを有効成分として含有する、SARS コロナウイルスの感染を予防するためのワクチン。

## 【請求項 17】

請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の抗原提示細胞を有効成分として含有する、S

A R S コロナウイルス特異的な H L A - A 2 拘束性 C T L の誘導剤。

【請求項 1 8】

請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の抗原提示細胞を有効成分として含有する、S A R S コロナウイルスの感染を予防するためのワクチン。

【請求項 1 9】

C p G - D N A をさらに含む、請求項 1 3 又は 1 5 に記載の S A R S コロナウイルス特異的な H L A - A 2 拘束性 C T L の誘導剤。

【請求項 2 0】

C p G - D N A をさらに含む、請求項 1 4 又は 1 6 に記載の S A R S コロナウイルスの感染を予防するためのワクチン。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 8 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 8 1】

(実施例 1 : C T L エピトープの予測)

2 種類のエピトープ予測コンピュータソフト B I M A S ( U R L : [http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)) 及び S Y F P E I T H I ( U R L : <http://www.syfpeithi.de/>) を用いて、p p 1 a のエピトープ候補を検索した。H L A 分子 : H L A - A \* 0 2 0 1、及び、ペプチド長 : 9 ~ 1 0 アミノ酸残基を対象として検索した中から、2 種類の解析方法の両方において高い予測スコアを示すエピトープ候補ペプチドを 3 0 種類選抜した。これら 3 0 種類のエピトープ候補ペプチドのアミノ酸配列を表 1 に示す。3 0 種類のエピトープ候補ペプチドについて、それぞれ合成ペプチドを作製し、実際にエピトープとして機能し得るペプチドを検索し、同定した 9 種類のエピトープペプチドの機能をさらに解析するために以下の実施例 4 及び 5 を行った。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 0 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 0 6】

C F S E 標識された標的細胞を移入したマウスにおけるフローサイトメトリーによる C F S E の染色プロットを図 3 に示す。各グラフの一番右のピークがペプチドをパルスした細胞の集団を示し、右から二番目のピークがペプチドをパルスしていない細胞を示す。それぞれの C T L エピトープペプチドにおいて、リボソームを免疫したコントロール ( 左のグラフ ) に比べ、ペプチド結合リボソームを免疫したもの ( 右のグラフ ) では、ペプチドをパルスした細胞数が減少していることがわかった。C T L による標的細胞のペプチド特異的溶解率 ( % ) は、それぞれ p p 1 a - 2 1 8 7 : 7 9 . 2 %、p p 1 a - 2 3 4 0 : 6 8 . 5 %、p p 1 a - 2 7 5 5 : 7 0 . 5 %、p p 1 a - 2 9 9 0 : 7 3 . 4 % 及び p p 1 a - 3 7 0 9 : 9 6 . 3 % であり、いずれも高い C T L 応答活性を持つことが明らかとなった。中でも、p p 1 a - 3 7 0 9 は特に高い C T L 応答活性を持つことが分かった。したがって、これらの C T L エピトープペプチド ( p p 1 a - 2 1 8 7、p p 1 a - 2 3 4 0、p p 1 a - 2 7 5 5、p p 1 a - 2 9 9 0 及び p p 1 a - 3 7 0 9 ; 配列番号 1 0 , 1 2 , 1 5 , 1 7 及び 2 4 ) は、C T L 応答活性の高いドミナントペプチドであることが明らかとなった。

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/JP2009/070043
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C07K7/06(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K39/215(2006.01)i, A61K47/24(2006.01)i, A61K47/26(2006.01)i, A61K47/28(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, C12N5/078(2010.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K7/06, A61K9/127, A61K35/76, A61K39/215, A61K47/24, A61K47/26, A61K47/28, A61P31/12, C12N5/06		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLus/REGISTRY (STN), CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2004/110349 A2 (SIGA TECHNOLOGIES, INC.), 23 December 2004 (23.12.2004), entire text; particularly, claim 2, sequence no.15, 19 (Family: none)	1,10-14, 17-20/2-9, 15,16
Y	TANEICHI, M. et al., Antigen Chemically Coupled to the Surface of Liposomes Are Cross-Presented to CD8+ T Cells and Induce Potent Antitumor Immunity, J. Immunol., 2006, Vol.177, P.2324-2330, entire text	2-9,15,16
Y	NAGATA, T. et al., Peptides coupled to the surface of a kind of liposome protect infection of influenza viruses, Vaccine, 2007, Vol.25, P.4914-4921, entire text	2-9,15,16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 December, 2009 (17.12.09)		Date of mailing of the international search report 28 December, 2009 (28.12.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/070043

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHONG, X. et al., B-Cell Responses in Patients Who Have Recovered from Severe Acute Respiratory Syndrome Target a Dominant Site in the S2 Domain of the Surface Spike Glycoprotein, <i>J. Virol.</i> , 2005, Vol.79, No.6, P.3401-3408, entire text, particularly, fig. 1	1,10-14, 17-20
A	LI, C. K. et al., T Cell Responses to Whole SARS Coronavirus in Humans, <i>J. Immunol.</i> , 2008.10, Vol.181, P.5490-5500, fig. 4, 5	1,10-14, 17-20
A	ZHOU, M. et al., Screening and Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus-Specific CTL Epitopes, <i>J. Immunol.</i> , 2006, Vol.177, P.2138-2145, entire text	1,10-14, 17-20
A	WO 2004/096842 A2 (BC CANCER AGENCY), 11 November 2004 (11.11.2004), entire text & US 2007/0258999 A1	1,10-14, 17-20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/070043

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The "peptides comprising the amino acid sequences respectively selected from the group consisting of the sequences depicted in SEQ ID NOs:10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 23 and 24" claimed in claim 1 share no common chemical structure, and only a common technical feature among the peptides resides in a matter that each of the peptides contains an epitope derived from severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus polyprotein ppla protein. However, the technical feature is a known matter, and cannot be regarded as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2, second sentence.  
(continued to extra sheet)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2009/070043

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Consequently, the above-stated group of inventions cannot be regarded as a group of inventions so linked to one another as to form a single general inventive concept and include nine groups of inventions respectively relating to nine different peptides.



国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 7 0 0 4 3	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K7/06(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K39/215(2006.01)i, A61K47/24(2006.01)i, A61K47/26(2006.01)i, A61K47/28(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, C12N5/078(2010.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K7/06, A61K9/127, A61K35/76, A61K39/215, A61K47/24, A61K47/26, A61K47/28, A61P31/12, C12N5/06			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2009年 日本国実用新案登録公報 1996-2009年 日本国登録実用新案公報 1994-2009年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPus/REGISTRY (STN), CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X / Y	WO 2004/110349 A2 (SIGA TECHNOLOGIES, INC.) 2004.12.23, 全文、 特に請求項2記載の配列番号15及び19 (ファミリーなし)	1, 10-14, 17-20/ 2-9, 15, 16	
Y	TANEICHI, M. et al., Antigen Chemically Coupled to the Surface of Liposomes Are Cross-Presented to CD8+ T Cells and Induce Potent Antitumor Immunity, J. Immunol., 2006, Vol.177, P.2324-2330, 全文	2-9, 15, 16	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 17.12.2009		国際調査報告の発送日 28.12.2009	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 崇之	4 B 4 1 5 2
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2009/070043
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	NAGATA, T. et al., Peptides coupled to the surface of a kind of liposome protect infection of influenza viruses, Vaccine, 2007, Vol. 25, P. 4914-4921, 全文	2-9, 15, 16
A	ZHONG, X. et al., B-Cell Responses in Patients Who Have Recovered from Severe Acute Respiratory Syndrome Target a Dominant Site in the S2 Domain of the Surface Spike Glycoprotein, J. Virol., 2005, Vol. 79, No. 6, P. 3401-3408, 全文、特に図 1	1, 10-14, 17-20
A	LI, C. K. et al., T Cell Responses to Whole SARS Coronavirus in Humans, J. Immunol., 2008. 10, Vol. 181, P. 5490-5500, 図 4 及び 図 5	1, 10-14, 17-20
A	ZHOU, M. et al., Screening and Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus-Specific CTL Epitopes, J. Immunol., 2006, Vol. 177, P. 2138-2145, 全文	1, 10-14, 17-20
A	WO 2004/096842 A2 (BC CANCER AGENCY) 2004. 11. 11, 全文 & US 2007/0258999 A1	1, 10-14, 17-20

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JP2009/070043
第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)	
法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。	
<p>1. <input type="checkbox"/> 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。</p>	
第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)	
次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。	
<p>請求項1に記載された「配列番号10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 23及び24からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むペプチド」は、互いに共通の化学構造を有するものではなく、重症急性呼吸器症候群 (SARS) コロナウイルスポリプロテイン p p 1 a タンパク質由来のエピトープを含むペプチドであることにおいてのみ技術的特徴を共有するものであるが、そのような技術的特徴は公知の事項であるから、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴ではない。</p> <p>よって、これら一群の発明は、単一の一般的発明概念を形成するように関連している一群の発明であるとはいえず、異なった9個のペプチドに関する9個の発明からなる発明群であるといえる。</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。</p>	
追加調査手数料の異議の申立てに関する注意	
<p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。</p>	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/215 (2006.01)	A 6 1 K 39/215	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 松井 政則  
埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 3 8 学校法人埼玉医科大学内

(72) 発明者 内田 哲也  
東京都新宿区戸山 1 - 2 3 - 1 国立感染症研究所内

(72) 発明者 小田 洋  
神奈川県川崎市川崎区千鳥町 3 - 3 日油株式会社内

F ターム(参考) 4B065 AA94X AC14 BB19 CA24 CA45  
4C076 AA19 CC06 DD63 DD70Q FF36 FF63 FF68 GG45  
4C084 AA01 AA02 AA03 BA01 BA17 BA23 CA01 MA24 NA03 NA14  
ZB091 ZB331  
4C085 AA03 BA71 BB13 CC32 DD11 EE01  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA50 BA55 DA86 EA29

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。